

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/74703 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 38/16, 7/00, A61P 25/00 // C07K 14/33 (74) Anwälte: BETTENHAUSEN, Berthold usw.; Dehmel & Bettenhausen, Müllerstrasse 1, D-80469 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01777 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 26. Mai 2000 (26.05.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) Angaben zur Priorität: 199 25 739.6 7. Juni 1999 (07.06.1999) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND CONSULTING MBH [DE/DE]; Hermannswerder Haus 17, D-14473 Potsdam (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): BIGALKE, Hans [DE/DE]; Böttcherstrasse 4, D-30419 Hannover (DE). FREVERT, Jürgen [DE/DE]; Hermannswerder Haus 17, D-14473 Potsdam (DE).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT COMPRISING A BOTULINUM NEUROTOXIN

(54) Bezeichnung: THERAPEUTIKUM MIT EINEM BOTULINUM-NEUROTOXIN

(57) Abstract: The invention relates to a pharmaceutical preparation containing one of the botulinum neurotoxins of *Clostridium botulinum* of types A, B, C, D, E, F or G or a mixture of two or more of these neurotoxins. The inventive preparation is characterized in that the neurotoxin or the mixture of neurotoxins does not contain the complexing proteins which, together with the neurotoxins, naturally form the botulinum neurotoxin complexes.

(57) Zusammenfassung: Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eines der Botulinum-Neurotoxine von *Clostridium botulinum* der Typen A, B, C, D, E, F oder G oder ein Gemisch von zwei oder mehr dieser Neurotoxine, dadurch gekennzeichnet, dass das Neurotoxin bzw. das Gemisch der Neurotoxine frei ist von den komplexierenden Proteinen, die natürlicherweise zusammen mit den Neurotoxinen die Botulinum-Neurotoxin-Komplexe bilden.

WO 00/74703 A2

5

Therapeutikum mit einem Botulinum-Neurotoxin

Die vorliegende Erfindung betrifft pharmazeutische Zubereitungen, die ein Botulinum-Neurotoxin von *Clostridium botulinum* enthalten, wobei das Neurotoxin frei ist von den komplexierenden Proteinen, die natürlicherweise in dem Komplex vorliegen. Die unmittelbare Folge davon ist die der vorliegenden Erfindung zu Grunde liegende Erkenntnis, dass das freie Neurotoxin im Gegensatz zum Komplex im Patienten zu keiner oder nur zu einer deutlich verminderten Induktion neutralisierender Antikörper führt. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von Botulinum-Neurotoxinen von *Clostridium botulinum* zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Erkrankungen des Nervensystems. Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der Botulinum-Neurotoxine von *Clostridium botulinum* für die kosmetische Behandlung.

Clostridium botulinum Toxinkomplex Typ A (M_r 900.000) wird seit mehreren Jahren zur Therapie verschiedener Dystonien eingesetzt. Derzeit sind zwei verschiedene, diesen Komplex enthaltende Präparate für die Behandlung des *Blepharospasmus*, hämifacialer Spasmen und des *Torticollis spasmodicus* zugelassen: BOTOX® und DYSPORT®. Die Therapie weiterer Erkrankungen des Nervensystems (z. B. Spastizitäten, Migräne, Lumbalgie, Cervicalsyndrom, Hypersalivation) wird derzeit klinisch geprüft. Die Präparate werden außerdem bei kosmetischen Indikationen wie Hyperhidrose und ausgeprägter Faltenbildung eingesetzt. Auch die übrigen *Clostridium botulinum* Toxinkomplexe (der Typen B, C, D, E, F, G) eignen sich für diese Therapien. Allerdings gibt es derzeit noch kein zugelassenes Produkt auf dem Markt, das Einsender Toxine vom Typ B-G enthält.

Botulinumtoxin-Komplexe setzen sich aus einem Gemisch clostridieller Proteine zusammen. Dies sind Hämagglutinine mit unterschiedlichen Molekularmassen, ein nicht-toxisches nicht-hämagglutinierendes Protein (M_r ca. 120.000) und ein Neurotoxin (M_r ca. 150.000). Sie bilden einen säurestabilen Komplex, der für die orale Toxizität bei Lebensmittelintoxikationen verantwortlich ist. Im Gegensatz zum reinen Neurotoxin widersteht der Komplex dem aggressiven

Milieu im Magen-Darm-Trakt und ermöglicht die enterale Resorption des Neurotoxins, welches über den Blutkreislauf oder das Lymphsystem die Zielzellen erreicht und dort eine Blockade der Transmitterfreisetzung auslöst. Daraufhin kommt es zur Paralyse der quergestreiften und glatten Muskulatur und zum Versiegen verschiedener vegetativer Funktionen. Vergiftete Patienten sterben an einer Insuffizienz der respiratorischen Muskulatur. Da das reine Neurotoxin im Magen-Darm-Trakt abgebaut und somit nicht enteral resorbiert wird, ist es nach einer Ingestion nicht giftig. Parenteral appliziert unterscheiden sich die therapeutischen Wirkungen des Neurotoxins und des Komplexes nicht, denn der Komplex zerfällt im Gewebe in seine Bestandteile, und nur das Neurotoxin wird in die Zielzellen aufgenommen.

Zur therapeutischen Anwendung wird der Komplex nach dem heutigen Stand der Technik direkt in dystone oder spastische Muskel injiziert, wo das Neurotoxin bei physiologischem pH aus dem Komplex freigesetzt wird und die erwünschte pharmakologische Wirkung hervorruft. Obwohl der Komplex nur in äußerst geringen Dosen appliziert wird (1-25 ng, je nach Indikation und Größe des betroffenen Muskels), kommt es nach wiederholten Injektionen bei einer beträchtlichen Anzahl der Patienten zur Bildung von spezifischen, neutralisierenden Antikörpern, die auch gegen das Neurotoxin gerichtet sind. Unmittelbare Folge ist, dass Antikörper-positive Patienten auf den Komplex nicht mehr ansprechen. Sie könnten aber mit anderen Toxintypen behandelt werden, von denen allerdings keiner zur Therapie zugelassen ist. Wenn der Patient alle Toxin-Typen durchprobiert und Antikörper gegen sie gebildet hat, ist die weitere Applikation eines Botulinumtoxin-Komplexes (egal welchen Typs) nicht mehr hilfreich. Dabei ist zu berücksichtigen, dass jede Gabe des Komplexes zu einer Erhöhung des Antikörper-Titers beiträgt bis zu dem Punkt, an dem eine weitere Applikation des Komplexes keinen Sinn mehr macht, weil kein Effekt mehr erzielt wird. Bis der Antikörper-Titer nennenswert gesunken ist, vergehen oft Jahre, so dass diese Patienten über lange Zeiträume nicht (mit Botulinum-Neurotoxin) behandelt werden (können).

Die Bildung von spezifischen Antikörpern wird durch zwei Faktoren begünstigt. Zum einen bleibt das Neurotoxin, fixiert im Komplex, über einen längeren Zeitraum im Gewebe liegen und kann ins Gewebe wandernde Immunzellen zur Antikörperbildung aktivieren. Die lange Verweildauer führt jedoch zu keiner gesteigerten Aufnahme in die Zielzellen, denn vergiftete Zielzellen können kein Toxin mehr aufnehmen. Das langsam aus dem Komplex herausdissoziierende Neurotoxin ist also nur noch immunologisch wirksam. Zum anderen verstärken die im Komplex enthaltenen Proteine eine Immunantwort. Hämagglutinine sind

Lektine, also Proteine, die sich durch eine hohe Affinität zu bestimmten Zuckern auszeichnen. Aufgrund ihrer Bindung an Zuckerstrukturen wirken Lektine immunstimulierend. So konnte gezeigt werden, daß die Lektine Concanavalin A, Phytohämagglutinin und Pokeweed Mitogen die T- und B-Lymphozyten aktivieren. Die Hämagglutinine der Botulinumtoxin-Komplexe, die ebenfalls an membranständige Zucker binden, können also in ähnlicher Weise als Immunadjuvantien fungieren und zur Antikörperbildung und damit zum Therapieversagen beitragen.

Deswegen stellte sich für die Erfinder der vorliegenden Erfindung die Aufgabe, einen alternativen Behandlungsweg für oben genannte Erkrankungen und Störungen zu entwickeln. Insbesondere wollten die Erfinder einen geeigneten Wirkstoff vorschlagen, mit dem Patienten, die bereits neutralisierende Antikörper gebildet haben, therapiert werden können.

Als Lösung der oben gestellten Aufgabe, als Alternative zu den beiden kommerziellen Präparaten aus Botulinumtoxin-Komplex des Typs A, BOTOX® und DYSPORT® und auch als Alternative zu den im Stand der Technik beschriebenen Komplexen der übrigen Typen (B, C, D, E, F, G), wurde ein neues Arzneimittel entwickelt, welches nur reines Neurotoxin (Typ A bzw. B, C, D, E, F, G) enthält und frei von Hämagglutininen und anderen körperfremden Proteinen ist. Wegen seiner geringeren Molekularmasse diffundiert es schneller zu den Zielzellen, in die es aufgenommen wird, bevor Immunzellen, von Hämagglutininen angelockt, aktiviert werden. In Antigenitätsstudien fanden wir, daß das reine Neurotoxin aller Typen - im Unterschied zu kommerziellen Präparaten des Typs A und den Komplexen der Typen B bis G keine oder allenfalls eine sehr geringe Bildung von Antikörpern auslöst. Bei therapeutischem Einsatz dieser neu entwickelten Arzneimittel (reines Neurotoxin der Typen A, B, C, D, E, F, G) kommt es auch nach wiederholten Applikationen zu keinem Antikörper-bedingten Therapieversagen. Ferner konnte gezeigt werden, daß sich die reinen Neurotoxine wegen ihrer sofortigen Bioverfügbarkeit auch weiterhin zur Therapie von Patienten eignen, die nach Applikation eines Botulinumtoxin-Komplexes, z.B. nach Behandlung mit BOTOX® oder DYSPORT®, einen Antikörpertiter gegen den entsprechenden Typ entwickelt haben (sog. secondary non-responders), also einer weiteren Behandlung mit BOTOX® oder DYSPORT® nicht mehr zugänglich sind, da die Verabreichung der kommerziellen Toxine keine Linderung der Beschwerden mehr bringt.

Das erfindungsgemäß bereitgestellte Arzneimittel eignet sich als Therapeutikum besonders bei Patienten, die einen Antikörper-Titer gegen ein Botulinum-Toxin, insbesondere gegen das des

Typs A, aufweisen. Besonders geeignet ist das erfindungsgemäße Pharmazeutikum (reines Neurotoxin oder Gemisch von mehreren reinen Neurotoxinen) bei solchen Patienten, die einen Antikörper-Titer von nicht größer als 50, bevorzugt nicht größer als 30, mehr bevorzugt nicht größer als 20, besonders bevorzugt nicht mehr als 10, und ganz besonders bevorzugt nicht mehr als 5 mU/ml aufweisen. Dabei ist 1 mU Antikörper diejenige Menge an Antikörper, die 10 U Toxin neutralisiert.

Andererseits kann das erfindungsgemäße Arzneimittel besonders vorteilhafterweise bei solchen Personen eingesetzt werden, die noch nie zuvor, oder schon lange Jahre nicht mehr, mit Botulinum-Neurotoxin behandelt worden sind, da deren Antikörper-Titer von Anfang an niedrig oder gleich Null ist. Das Vorteilhafte an der vorliegenden Erfindung besteht dann darin, dass der Titer dieser Patienten durch die Behandlung mit dem reinen Toxin gemäß der vorliegenden Erfindung nicht, oder allenfalls sehr unwesentlich, erhöht wird. Mit anderen Worten, das erfindungsgemäße Therapeutikum kann über lange Zeiträume verabreicht werden, ohne dass es seine Wirkung einbüßt.

Die Induktion von Antikörpern bei der Therapie mit einem *C. botulinum* Toxin wird also dadurch verhindert, dass statt der hochmolekularen toxischen Komplexe ein reines Neurotoxin appliziert wird. Das von den Komplexproteinen vollständig getrennte Neurotoxin ist sofort bioverfügbar und kann unmittelbar an die Nervenendigungen der motorischen Endplatten binden.

Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft somit eine pharmazeutische Zubereitung, die wenigstens eines der Botulinum-Neurotoxine von *Clostridium botulinum* der Typen A, B, C, D, E, F oder G (oder ein Gemisch von zwei oder mehr dieser Neurotoxine) enthält, wobei alle Neurotoxine frei sind von den komplexierenden Proteinen, die natürlicherweise in dem Komplex vorliegen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um eine pharmazeutische Zubereitung, die dadurch gekennzeichnet ist, dass das Neurotoxin bzw. das Gemisch der Neurotoxine im Patienten zu keiner oder, im Vergleich zu den Komplexen, nur zu einer verminderten Induktion neutralisierender Antikörper führt.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform sieht eine pharmazeutische Zubereitung vor, die als Neurotoxin bzw. als Gemisch der Neurotoxine ein natürliches Neurotoxin bzw. ein Gemisch natürlicher Neurotoxine enthält.

- 5 Eine weitere bevorzugte Ausführungsform sieht eine pharmazeutische Zubereitung vor, die als Neurotoxin bzw. als Gemisch der Neurotoxine ein rekombinantes Neurotoxin bzw. ein Gemisch rekombinanter Neurotoxine enthält.

Eine weiterhin bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen pharmazeutischen
10 Zubereitung sieht eine Zubereitung vor, die als Neurotoxin das Neurotoxin von *Clostridium botulinum* Typ A oder B bzw. als Gemisch der Neurotoxine ein Gemisch der Neurotoxine von *Clostridium botulinum* Typ A und B aufweist.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf die Verwendung der
15 Botulinum-Neurotoxine von *Clostridium botulinum* der Typen A, B, C, D, E, F oder G oder eines Gemisches von zwei oder mehr dieser Neurotoxine zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Erkrankungen des Nervensystems bzw. von Dystonien. Bei den Erkrankungen des Nervensystems bzw. den Dystonien handelt es sich gemäß einer bevorzugten Ausführungsform um Torticollis spasmodicus und Blepharospasmus, um Spastizitäten wie
20 Spitzfuß, hämifasciale Spasmen, Migräne, Lumbalgie, Cervicalsyndrom oder Hypersalivation.

Wiederum ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der Botulinum-Neurotoxine von *Clostridium botulinum* der Typen A, B, C, D, E, F oder G oder eines Gemisches von zwei oder mehr dieser Neurotoxine für die kosmetische Behandlung, wobei
25 eine kosmetische Behandlung zur Behandlung von Hyperhidrose und Faltenbildung, insbesondere im Gesichtsbereich, besonders bevorzugt ist.

Ganz besonders bevorzugt im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines der Neurotoxine allein oder im Gemisch zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung der
30 oben genannten Nervenerkrankungen bei solchen Personen (vorzugsweise Mensch, aber auch Tier), die bereits neutralisierende Antikörper gegen einen Botulinum-Neurotoxin-Komplex, insbesondere gegen den Komplex von *Clostridium botulinum* Typ A oder B, oder gegen mehrere Komplexe, insbesondere gegen die Komplexe von *Clostridium botulinum* Typ A und B, aufweisen (sogenannte secondary non-responders).

Die Neurotoxine, ihre Gemische bzw. die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen können als wässrige Lösung, insbesondere als wässrige Injektionslösung, aber auch als lyophilisierte Produkte vorliegen.

5

Die an sich bekannten reinen Neurotoxine der Typen A-G wurden hergestellt nach den Protokollen, die in den in der Literaturliste aufgeführten Veröffentlichungen enthalten sind. Beispielhaft ist die Aufreinigung von zwei Neurotoxinen (Typ A und B) in den nachfolgenden Beispielen beschrieben.

10

Beispiel 1: Isolierung des reinen Neurotoxins

Das reine Neurotoxin aus *Clostridium botulinum* Typ A wird nach einem Verfahren gewonnen, das sich an das Verfahren von DasGupta & Sathyamoorthy anlehnt. *Clostridium botulinum* Typ A wird in einem 20-l-Fermenter in einem Medium kultiviert, das aus 2% Proteose Peptone, 1% Yeast-Extrakt, 1% Glukose und 0.05% Natriumthioglycolat besteht. Nach 72 Stunden Wachstum wird das Toxin durch Zugabe von 3N H₂SO₄ (End-pH = 3.5) gefällt. Die präzipitierte und zentrifugierte Biomasse wird mit 0.2 M Natriumphosphatpuffer pH 6.0 extrahiert.

15

20 Nach Abtrennung der Nukleinsäuren durch Fällung mit Protaminsulfat wird das Toxin durch Zugabe von Ammoniumsulfat gefällt. Das solubilisierete und gegen 50 mM Natriumphosphat pH 6.0 dialysierte Präzipitat wird auf einer DEAE-Sephadex-Säule beim gleichen pH-Wert gebunden und mit 150 mM NaCl abgelöst. Anschließend erfolgt eine Chromatographie über eine QAE-Sephadex-Säule, die mit einem 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.9 äquilibriert wurde. Das Toxin wird über einen NaCl-Gradienten eluiert. Im letzten Schritt wird das Toxin über SP-Sephadex bei pH 7.0 chromatographiert. Das gebundene Toxin wird dabei mittels eines NaCl-Gradienten (0 – 300 mM) von der Säule abgelöst. Das gereinigte Toxin wird in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert und weist eine Reinheit von 95 ± 5 % auf. Die biologische Aktivität wird im Maus LD₅₀-Assay bestimmt: einer LD₅₀-Einheit entsprechen 4.8 pg Protein.

25

30

Beispiel 2: Herstellung eines Botulinum-Neurotoxin-haltigen Fertigarzneimittels

Mit dem gereinigten Neurotoxin aus Beispiel 1 wird eine Lösung hergestellt, die 200 Maus-LD₅₀-Einheiten, 10 mg Saccharose und 2 mg humanes Serumalbumin pro ml enthält. 0.5 ml der

Lösung werden in Vials abgefüllt und gefriergetrocknet. Die Lyophilisate werden mit physiologischer Kochsalzlösung rekonstituiert und die biologische Aktivität bestimmt. Die Vials enthalten 100 ± 30 LD₅₀-Einheiten.

5 **Beispiel 3: Isolierung von reinem Neurotoxin B**

Clostridium botulinum Typ B wird im gleichen Medium und unter gleichen Bedingungen wie Typ A kultiviert und bis zur Ammoniumsulfatfällung aufgearbeitet. Anschließend erfolgt wiederum eine DEAE-Sephadex-Chromatographie bei pH 6.0. Die mit 150 mM NaCl von der Säule eluierten Fraktionen werden vereinigt und gegen Natriumphosphat pH 7.0 dialysiert, woran sich eine Chromatographie über QAE-Sephadex anschließt. Die toxinhaltigen Fraktionen werden weiter über eine DEAE-Sephadex-Chromatographie bei pH 8.5 (50 mM Tris/HCl pH 8.5) chromatographiert.

Schließlich erhält man das hochreine Botulinumtoxin Typ B über eine Chromatographie an Hydroxylapatit äquilibriert mit 10 mM Na-Phosphat pH 8.0. Das gebundene homogene Toxin wird mit 80 mM Na-Phosphat pH 8.0 eluiert und anschließend die biologische Aktivität im LD₅₀-Assay bestimmt ($2 - 4 \times 10^7$ LD₅₀-Einheiten/mg Protein).

Beispiel 4: Nachweis von Antikörpern

20 20 Kaninchen wurden 25 U BOTOX® über einen Zeitraum von 12 Wochen im Abstand von 14 Tagen (5 Injektionen) intracutan injiziert. Nach 3 Wochen und dann im Abstand von 14 Tagen wurde Serum gewonnen.

Antikörper gegen *Clostridium botulinum* Neurotoxin A wurden mit einem Enzymimmunoassay nachgewiesen, indem das homogene Neurotoxin auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert war. An das Neurotoxin bindende Antikörper wurden mittels eines zweiten, enzymmarkierten Antikörpers quantifiziert.

Das Ergebnis ist in Tabelle 1 dargestellt. Bereits 5 Wochen nach der ersten Applikation konnten bei 5 Kaninchen Antikörper nachgewiesen werden. Nach 11 Wochen enthielten Seren von 17 Kaninchen, also 85% der eingesetzten Tiere, Antikörper gegen das Neurotoxin. Im biologischen Aktivitätstest wurde gezeigt, daß 12 der 17 Seren neutralisierende Antikörper enthielten (Tabelle 2).

Tab. 1 Bestimmung von Serumproben (1:100 verdünnt) aus Kaninchen, die mit BOTOX® behandelt wurden mit einem Enzym-Immunoassay. $OD_{490nm} > 0.1$ sind angegeben. Alle OD-Werte sind korrigiert mit den OD-Werten der Präimmunseren (OD ca. 0,150).

Kaninchen Nr.	3. Woche	5. Woche	7. Woche	9. Woche	11. Woche
1	-	-	-	0,11	0,36
2	-	-	-	2,36	2,23
3	-	-	0,57	1,43	1,44
4	-	-	0,68	1,68	0,93
5	-	0,97	3,52	3,49	3,44
6	-	-	1,34	2,32	2,70
7	-	-	2,13	3,09	3,00
8 *	-	0,53	1,47	2,75	2,75
9	-	-	0,43	2,44	2,85
10	-	-	2,99	3,15	2,73
11	-	0,10	2,42	2,45	1,93
12	-	-	-	1,13	1,95
13	-	-	-	-	1,89
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	-	2,93	3,62	3,72	3,44
18	-	-	1,18	2,28	2,62
19	-	-	0,43	0,43	0,81
20	-	1,65	3,20	2,97	2,88

* Die Werte wurden nicht korrigiert, da kein Präimmunserum vorhanden war
 "-" bedeutet Optische Dichte (OD_{490}) $< 0,1$

Tab. 2 Neutralisation durch Seren von Kaninchen, die mit BOTOX[®] (Woche 11 nach der ersten Immunisierung) im Maus-Hemidiaphragma-Assay (Nachweisgrenze: 0,35 mU/ml Antikörper)

Kaninchen	Neutralisation mU/ml
1	2,0
2	n. d.
3	n. d.
4	> 10
5	> 100
6	n. d.
7	> 10
8	> 10
9	n. d.
10	n. d.
11	n. d.
12	> 10
13	n. d.
14	n. d.
15	< 0,35
16	0,4
17	> 10
18	> 10
19	2,0
20	> 10

5

n. d. = nicht bestimmt

Beispiel 5: Antigenitätsstest mit Marktprodukt und reinem Neurotoxin

Nachdem gezeigt wurde, daß der Komplex aus Neurotoxin und Hämagglutininen und dem nicht-toxischen, nicht-hämagglutinierenden Protein die Bildung neutralisierender Antikörper auslöst, wurde die immunogene Wirkung des reinen Neurotoxins (Typ A) geprüft. Dazu wurden 8 Kaninchen mit dem Toxinkomplex und 12 Kaninchen mit dem reinen Toxin behandelt. Nach dem oben beschriebenen Verfahren (siehe Beispiel 1) wurden 25 U des jeweiligen Präparates intracutan appliziert. Die Menge an Neurotoxin, gemessen als Gewicht, war in beiden Präparaten

gleich (200 pg/Dosis), wie in einem ELISA nachgewiesen wurde. BOTOX[®] enthielt zusätzlich noch Komplexproteine (ca. 800 pg/Dosis).

Vier der acht mit BOTOX[®] behandelten Tiere zeigten im ELISA einen Antikörpertiter, während bei den 12 mit reinem Neurotoxin behandelten Tieren keine Antikörper gegen das reine Neurotoxin nachzuweisen waren. Das Ergebnis wurde im biologischen Aktivitätstest bestätigt. Alle vier Kaninchenserum enthielten neutralisierende Antikörpertiter, die eine Toxinwirkung verhinderten (Tabelle 3).

10

Tab. 3 Neutralisation durch Seren (1:3 verdünnt) von Kaninchen, die mit BOTOX[®] (Woche 11 nach der ersten Immunisierung) im Maus-Hemidiaphragma-Assay (Nachweisgrenze: 1 mU/ml Antikörper)

Kaninchen	Neutralisation mU/ml
1	12 mU
2	> 30 mU
3	4.5 mU
8	> 30 mU

15

Beispiel 6: (Vergleichsbeispiel)

In diesem Experiment wurde die Antikörperbildung durch BOTOX[®] mit der durch DYSPORT[®] verglichen. Hierzu wurden jeweils zehn Kaninchen entweder mit BOTOX[®] (Gruppe 1), mit DYSPORT[®] (Gruppe 2) oder mit dem reinen Neurotoxin (Gruppe 3) nach beschriebenem Schema behandelt.

Während in Gruppe 1 und 2 mehr als 50% der Tiere einen neutralisierenden Antikörpertiter bildeten, waren die Seren aus den Tieren der Gruppe 3 frei von Antikörpern.

25

Beispiel 7: Klinischer Test

Ein Patient (Alter 45 Jahre), der über einen Zeitraum von 5 Jahren wegen eines *Torticollis spasmodicus* mit BOTOX[®] behandelt wurde, hatte eine Antikörpertiter von 3 mU/ml Serum

entwickelt. Weder BOTOX® noch DYSPORT® waren bei diesem Patienten therapeutisch wirksam. Ein Therapieversuch mit dem reinen Botulinum-Neurotoxin in einer Dosis von 145 U, welche äquivalent der zuletzt injizierten Dosis von BOTOX® war, führte innerhalb von 72 Stunden zur Lockerung des Muskels, zur Normalisierung der Kopfhaltung und zum
5 Verschwinden des Muskelschmerzes. Unerwünschte Wirkungen traten nicht auf.

Beispiel 8: Klinischer Test

Ein Patient (Alter 52 Jahre) wurde 3 Jahre wegen Cerebralparese mit BOTOX® behandelt. Er hatte einen Antikörpertiter von 1 mU/ml Serum entwickelt, die Therapie mußte deshalb
10 abgebrochen werden. Die Injektion von 200 U reinen Neurotoxins ermöglichte eine erfolgreiche Therapie.

Literatur

- 15 DasGupta, B.R. & Sathyamoorthy, V. (1984), Purification and Amino Acid Composition of Type A Botulinum Neurotoxin; *Toxicon* 22(3), p. 415 - 424
- De Jongh, K. S., Schwartzkoff, C. L. & Howden, M. E. H. (1989), *Clostridium botulinum* Type D Neurotoxin Purification and Detection; *Toxicon* 27 (2), p. 221 - 228
- Schmidt, J. J. & Siegel, L. S. (1986), Purification of Type E Botulinum Neurotoxin by High-
20 Performance Ion Exchange Chromatography; *Analyt. Biochemistry* 156, p. 213 - 219
- Nukina, M., Mochida, Y., Sakaguchi, S. & Sakaguchi, G. (1988), Purification of *Clostridium botulinum* Type G Progenitor Toxin; *Zbl. Bakt. Hyg. A* 268, p. 220 - 227
- Terajima, J., Syuto, B., Ochanda, J. O. & Kubo, S. (1985), Purification and Characterization of Neurotoxin Produced by *Clostridium botulinum* Type C 6813; *Infection and Immunity* 48 (2), p.
25 312 - 317
- Wadsworth, J. D. F., Desai, M., Tranter, H. S. et al. (1990), Botulinum type F neurotoxin: Large-scale Purification and Characterization of its Binding to Rat Cerebrocortical Synaptosomes; *Biochem. J.* 268, p. 123 - 128

5

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eines der Botulinum-Neurotoxine von *Clostridium botulinum* der Typen A, B, C, D, E, F oder G oder ein Gemisch von zwei
10 oder mehr dieser Neurotoxine, dadurch gekennzeichnet, dass das Neurotoxin bzw. das Gemisch der Neurotoxine frei ist von den komplexierenden Proteinen, die natürlicherweise zusammen mit den Neurotoxinen die Botulinum-Neurotoxin-Komplexe bilden.
- 15 2. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Neurotoxin bzw. das Gemisch der Neurotoxine im Patienten zu keiner oder, im Vergleich zu den Komplexen, nur zu einer verminderten Induktion neutralisierender Antikörper führt.
- 20 3. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Neurotoxin bzw. das Gemisch der Neurotoxine ein natürliches Neurotoxin bzw. ein Gemisch natürlicher Neurotoxine ist oder enthält.
4. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das
25 Neurotoxin bzw. das Gemisch der Neurotoxine ein rekombinantes Neurotoxin bzw. ein Gemisch rekombinanter Neurotoxine ist oder enthält.
5. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Neurotoxin das Neurotoxin von *Clostridium botulinum* Typ A
30 oder B bzw. das Gemisch der Neurotoxine ein Gemisch der Neurotoxine von *Clostridium botulinum* Typ A und B ist oder enthält.
6. Verwendung der Botulinum-Neurotoxine von *Clostridium botulinum* der Typen A, B, C, D, E, F oder G oder eines Gemisches von zwei oder mehr dieser Neurotoxine zur

Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Erkrankungen des Nervensystems bzw. Dystonien.

7. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den
5 Erkrankungen des Nervensystem bzw. den Dystonien um Torticollis spasmodicus und
Blepharospasmus, Spastizitäten wie Spitzfuß, hämifasciale Spasmen, Migräne,
Lumbalgie, Cervicalsyndrom oder Hypersalivation handelt.
8. Verwendung der Botulinum-Neurotoxine von *Clostridium botulinum* der Typen A, B, C,
10 D, E, F oder G oder eines Gemisches von zwei oder mehr dieser Neurotoxine für die
kosmetische Behandlung.
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die kosmetische
15 Behandlung zur Behandlung von Hyperhidrose und Faltenbildung, insbesondere im
Gesichtsbereich, erfolgt.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die mit
dem Neurotoxin von *Clostridium botulinum* bzw. dem Gemisch der Neurotoxine zu
behandelnde Person ein Mensch oder Tier ist, der/das bereits neutralisierende Antikörper
20 gegen einen Botulinum-Neurotoxin-Komplex, insbesondere gegen den Komplex von
Clostridium botulinum Typ A oder B, oder gegen mehrere Komplexe, insbesondere
gegen die Komplexe von *Clostridium botulinum* Typ A und B, aufweist.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/74703 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 38/16**,
7/00, A61P 25/00 // C07K 14/33

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE00/01777**

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. Mai 2000 (26.05.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
199 25 739.6 7. Juni 1999 (07.06.1999) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECH-
NOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND CONSULT-
ING MBH [DE/DE]; Hermannswerder Haus 17, D-14473
Potsdam (DE).**

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BIGALKE, Hans
[DE/DE]; Böttcherstrasse 4, D-30419 Hannover (DE).
FREVERT, Jürgen [DE/DE]; Hermannswerder Haus 17,
D-14473 Potsdam (DE).**

(74) Anwälte: **BETTENHAUSEN, Berthold** usw.; Dehmel &
Bettenhausen, Müllerstrasse 1, D-80469 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Mit geänderten Ansprüchen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 26. April 2001

Veröffentlichungsdatum der geänderten Ansprüche:
7. Juni 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT COMPRISING A BOTULINUM NEUROTOXIN

(54) Bezeichnung: THERAPEUTIKUM MIT EINEM BOTULINUM-NEUROTOXIN

(57) Abstract: The invention relates to a pharmaceutical preparation containing one of the botulinum neurotoxins of *Clostridium botulinum* of types A, B, C, D, E, F or G or a mixture of two or more of these neurotoxins. The inventive preparation is characterized in that the neurotoxin or the mixture of neurotoxins does not contain the complexing proteins which, together with the neurotoxins, naturally form the botulinum neurotoxin complexes.

(57) Zusammenfassung: Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eines der Botulinum-Neurotoxine von *Clostridium botulinum* der Typen A, B, C, D, E, F oder G oder ein Gemisch von zwei oder mehr dieser Neurotoxine, dadurch gekennzeichnet, dass das Neurotoxin bzw. das Gemisch der Neurotoxine frei ist von den komplexierenden Proteinen, die natürlicherweise zusammen mit den Neurotoxinen die Botulinum-Neurotoxin-Komplexe bilden.

WO 00/74703 A3

GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 23. Februar 2001 (23.02.01) eingegangen;
ursprüngliche Ansprüche 6 und 8 geändert; alle weiteren Ansprüche unverändert (2 Seiten)]

5

1. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eines der Botulinum-Neurotoxine von *Clostridium botulinum* der Typen A, B, C, D, E, F oder G oder ein Gemisch von zwei oder mehr dieser Neurotoxine, dadurch gekennzeichnet, dass das Neurotoxin bzw. das
10 Gemisch der Neurotoxine frei ist von den komplexierenden Proteinen, die natürlicherweise zusammen mit den Neurotoxinen die Botulinum-Neurotoxin-Komplexe bilden.
2. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das
15 Neurotoxin bzw. das Gemisch der Neurotoxine im Patienten zu keiner oder, im Vergleich zu den Komplexen, nur zu einer verminderten Induktion neutralisierender Antikörper führt.
3. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das
20 Neurotoxin bzw. das Gemisch der Neurotoxine ein natürliches Neurotoxin bzw. ein Gemisch natürlicher Neurotoxine ist oder enthält.
4. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das
25 Neurotoxin bzw. das Gemisch der Neurotoxine ein rekombinantes Neurotoxin bzw. ein Gemisch rekombinanter Neurotoxine ist oder enthält.
5. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Neurotoxin das Neurotoxin von *Clostridium botulinum* Typ A oder B bzw. das Gemisch der Neurotoxine ein Gemisch der Neurotoxine von *Clostridium*
30 *botulinum* Typ A und B ist oder enthält.
6. Verwendung der Botulinum-Neurotoxine von *Clostridium botulinum* der Typen A, B, C, D, E, F oder G oder eines Gemisches von zwei oder mehr dieser Neurotoxine, wobei das
35 Neurotoxin bzw. das Gemisch der Neurotoxine frei ist von den komplexierenden Proteinen, die natürlicherweise zusammen mit den Neurotoxinen die Botulinum-

Neurotoxin-Komplexe bilden, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Erkrankungen des Nervensystems bzw. Dystonien.

- 5 7. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Erkrankungen des Nervensystem bzw. den Dystonien um Torticollis spasmodicus und Blepharospasmus, Spastizitäten wie Spitzfuß, hämifasciale Spasmen, Migräne, Lumbalgie, Cervicalsyndrom oder Hypersalivation handelt.
- 10 8. Verwendung der Botulinum-Neurotoxine von *Clostridium botulinum* der Typen A, B, C, D, E, F oder G oder eines Gemisches von zwei oder mehr dieser Neurotoxine, wobei das Neurotoxin bzw. das Gemisch der Neurotoxine frei ist von den komplexierenden Proteinen, die natürlicherweise zusammen mit den Neurotoxinen die Botulinum-Neurotoxin-Komplexe bilden, für die Herstellung eines Mittels für die kosmetische Behandlung.
- 15 9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die kosmetische Behandlung zur Behandlung von Hyperhidrose und Faltenbildung, insbesondere im Gesichtsbereich, erfolgt.
- 20 10. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die mit dem Neurotoxin von *Clostridium botulinum* bzw. dem Gemisch der Neurotoxine zu behandelnde Person ein Mensch oder Tier ist, der/das bereits neutralisierende Antikörper gegen einen Botulinum-Neurotoxin-Komplex, insbesondere gegen den Komplex von *Clostridium botulinum* Typ A oder B, oder gegen mehrere Komplexe, insbesondere
- 25 gegen die Komplexe von *Clostridium botulinum* Typ A und B, aufweist.